

## RESUMO

A alergia é frequentemente considerada um processo de reacção inflamatória mediada por um alergénio. As doenças alérgicas afectam essencialmente indivíduos atópicos com predisposição genética para sintetizar anticorpos IgE específicos contra alergénios ambientais comuns.

A apresentação dos alergénios por Células Apresentadoras de Antígeno resulta na polarização de células T específicas em células T helper 2 (Th2). Estas células, através da produção de IL-4 e IL-13, despoletam a síntese de IgE e, através da produção de IL-5, atraem e activam eosinófilos. Os anticorpos IgE específicos ligam-se a receptores de alta afinidade (FcεRI) de basófilos circulantes e mastócitos da pele e mucosas. No caso de exposição contínua ou re-exposição ao alergénio surge uma resposta bifásica com hipersensibilidade imediata e um componente inflamatório tardio. Na fase inicial ocorre desgranulação de mastócitos com libertação de mediadores inflamatórios como histamina, proteases, leucotrienos, prostaglandinas e citocinas. A fase tardia resulta da libertação adicional de mediadores inflamatórios desencadeada por eosinófilos, neutrófilos, basófilos, macrófagos e células T CD4<sup>+</sup>.

O melhor tratamento para a doença alérgica é a evicção dos alergénios, quando tal não é viável e apenas em indivíduos seleccionados, a imunoterapia específica pode modificar o curso da doença e melhorar a qualidade de vida.

A imunoterapia específica (ITE) consiste na administração de alergénios modificados induzindo o sistema imunitário a tolerar os alergénios envolvidos na reacção alérgica. O mecanismo de actuação da ITE não está completamente esclarecido, embora seja aceite a sua intervenção na produção de IgG e IgE, apresentação antigénica, activação de células T e actuação de mastócitos e eosinófilos.

Após ITE, ocorre elevação de IgG específica, nomeadamente IgG4, que actua como “bloqueador” impedindo a activação de basófilos, mastócitos IgE mediada e a ligação do complexo alérgénio-IgE ao receptor de baixa afinidade da IgE (FcγRII) que se encontra na superfície de células B, diminuindo a capacidade destas células apresentarem os alérgénios às células T específicas.

Outro mecanismo ITE consiste na elevação de células T reguladoras (Treg), as quais têm um papel fundamental na tolerância do sistema imunitário encontrando-se diminuídas em indivíduos alérgicos. A funcionalidade destas células requer expressão do factor de transcrição Fox p 3, IL-10 e TGF-β. A ITE actua ainda no desvio de células Th2 para células com o perfil Th1 (T helper 1), inibindo eosinófilos e mastócitos e diminuindo a produção de IgE.

Como foi referido o conhecimento do mecanismo de actuação da ITE está em constante actualização, havendo autores que apresentam novas propostas ainda em estudo, nomeadamente o papel da ITE na imunidade inata ou na indução da apoptose em células Th2, temas que serão abordados ao longo deste artigo de revisão.

Existem critérios para selecção de doentes a submeter a ITE. Esta pode ser administrada por via subcutânea ou sublingual sendo utilizados extractos padronizados de um ou mais alérgénios em doses progressivamente crescentes. A administração por via subcutânea deve ser efectuada exclusivamente em unidades de saúde especializadas, dado o risco de reacções sistémicas graves. Já a via sublingual pode ser administrada no domicílio, de acordo com indicações médicas rigorosas.

## **PALAVRAS-CHAVE**

*Alergia, Imunoterapia, Linfócitos T helper, Linfócitos T reguladores, Mediadores inflamatórios, Imunoterapia sublingual, Imunoterapia subcutânea.*

## **ABSTRACT**

Allergy is frequently considered an inflammation process allergen mediated. Usually allergic diseases appear mostly in individuals which have an inherited genetic predisposition to produce specific antibodies against common allergens.

The antigen (allergen) presentation results in a Th2 (T helper 2) differentiation of specific T cells. These cells, by producing interleucine (IL)-4 and IL-13 trigger the IgE synthesis, while by producing IL-5 they attract and activate eosinophils. Then IgEs bind to high affinity receptor (FcεRI) on effector cells such as basophils and mast cells. In case of continuous exposure or re-exposure a two phases response occurs: early and late phase of allergic reaction. The early phase reaction is a consequence of allergen molecules activating release of inflammatory mediators including histamine, proteases, leukotrienes prostaglandins and cytokines. The late phase response results from a further wave of inflammatory mediators released from the recruited cellular infiltrate of eosinophils, neutrophils, basophils, macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells.

The best treatment for allergic disease is allergen avoidance, however in selected patients where there is a clear demonstration of symptoms on exposure to an offending allergen and documentation of allergen-specific IgE, allergen-specific immunotherapy selectively modulates the immune response and is potentially curative.

Specific immunotherapy (SIT) involves administration of modified allergens that induce a state of clinical and immune tolerance to that allergen. The SIT mechanism isn't entirely known, however it acts at each step of the allergic reaction: IgE and IgG productions, antigen presentation, T cell activation and mast cell and eosinophil homing.

The elevation of specific IgG during SIT, notably IgG4 that is considered as blocking antibodies, preventing basophils and mast cells IgE mediated activation and the binding of

allergen-IgE complexes on the low affinity receptor for IgE (FcγRII) at the surface of B cells, thus decreasing the capacity of these cells to present the allergen to specific T cells.

Another SIT mechanism consist of the elevation of regulatory T cells which have a fundamental role in the immune system tolerance and which are low in allergic individuals.

The function of these cells requires expression of the transcription factor Fox p3, IL-10 e TGF-β. SIT also acts in the Th2 to Th1 (T helper 1) shift, inhibiting eosinophils and mast cells and decreasing IgE production.

As referred above the knowledge of the SIT acting mechanism is constantly being updated. Some authors present new proposals still under research, for example the role of SIT on innate immunity or on induction of apoptosis of Th2 cells, topics which are dealt with in these review article.

There is a criterion for the selection of patients to be submitted to SIT. There are two kinds of immunotherapy: subcutaneous or sublingual. Subcutaneous immunotherapy should be exclusively carried through in specialized health units due to the risk of serious systemic reactions. Sublingual immunotherapy may be administrated at home, according to rigorous medical orientation.

## **KEY-WORDS**

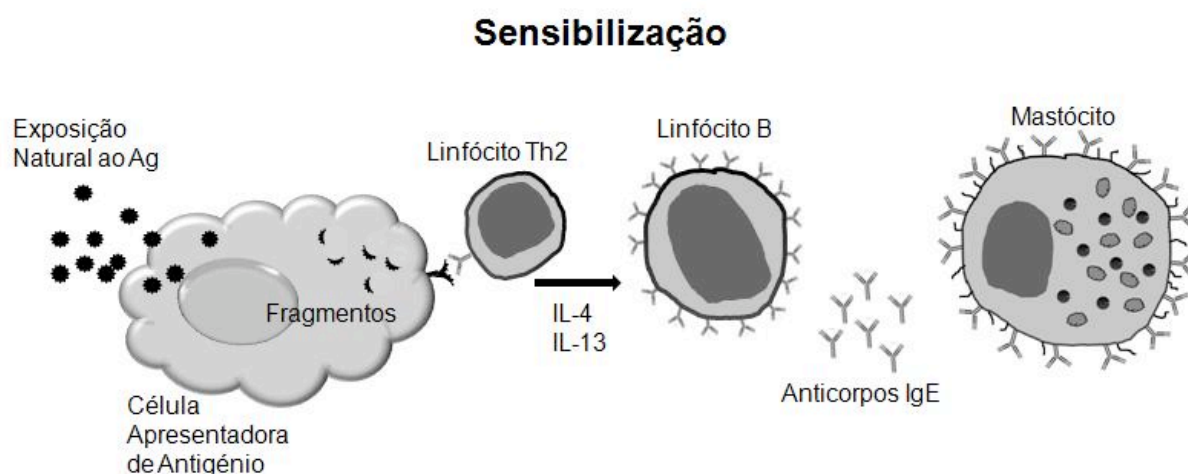
*Allergy, Immunotherapy, T helper lymphocytes, Regulatory T cells, Inflammatory mediators, Sublingual immunotherapy, Subcutaneous immunotherapy.*

# INTRODUÇÃO

A alergia resulta de uma reacção inapropriada do organismo contra proteínas ambientais inócuas - os antígenos. Apesar de todos os indivíduos estarem continuamente expostos a estes antígenos, só uma percentagem desenvolve reacções imunológicas adversas. Isto pode ser parcialmente explicado pelo facto da resposta imunológica normal se encontrar associada à indução de tolerância. No caso de incapacidade por parte do organismo de induzir tolerância a determinados antígenos pode ocorrer perpetuação da resposta imunitária, que, se for exagerada se traduz por alergia.

A prevalência e gravidade das doenças alérgicas, como a asma e a rinite alérgica, têm aumentado de uma forma dramática na última década nos países desenvolvidos, chegando a afectar mais de 20% da população (*Nauta et al., 2008*).

Na doença alérgica ocorre uma activação de células T *helper* 2 (Th2), alérgio-específicas (*Nauta et al., 2008*). A apresentação dos alérgenos por Células Apresentadoras de Antígeno resulta na polarização em células Th2 específicas. Estas células, através da produção de Interleucinas (IL) tais como a IL-4 e IL-13, despoletam a síntese de Imunoglobulina E (Ig E) e, através da produção de IL-5, atraem e activam eosinófilos. Os anticorpos IgE específicos ligam-se a receptores de alta afinidade (FcεRI) de basófilos circulantes e mastócitos da pele e mucosas (Figura 1). No caso de exposição contínua ou re-exposição ao alérgeno surge uma resposta bifásica traduzida por uma reacção imediata mais exsudativa seguida de um reacção com um componente inflamatório tardio (*Pipet et al., 2009* e *Rolland et al., 2009*).



**Figura 1:** Representa o conceito actual da patogenia da reacção alérgica. Em indivíduos com predisposição genética, a exposição primária a um alérgeno conduz à activação de Linfócitos Th2 e ao aumento de produção de IgE. *IL*, interleucina; *Ag*, antígeno; *Ig*, imunoglobulina. *Adaptado de Norman PS, 2004.*

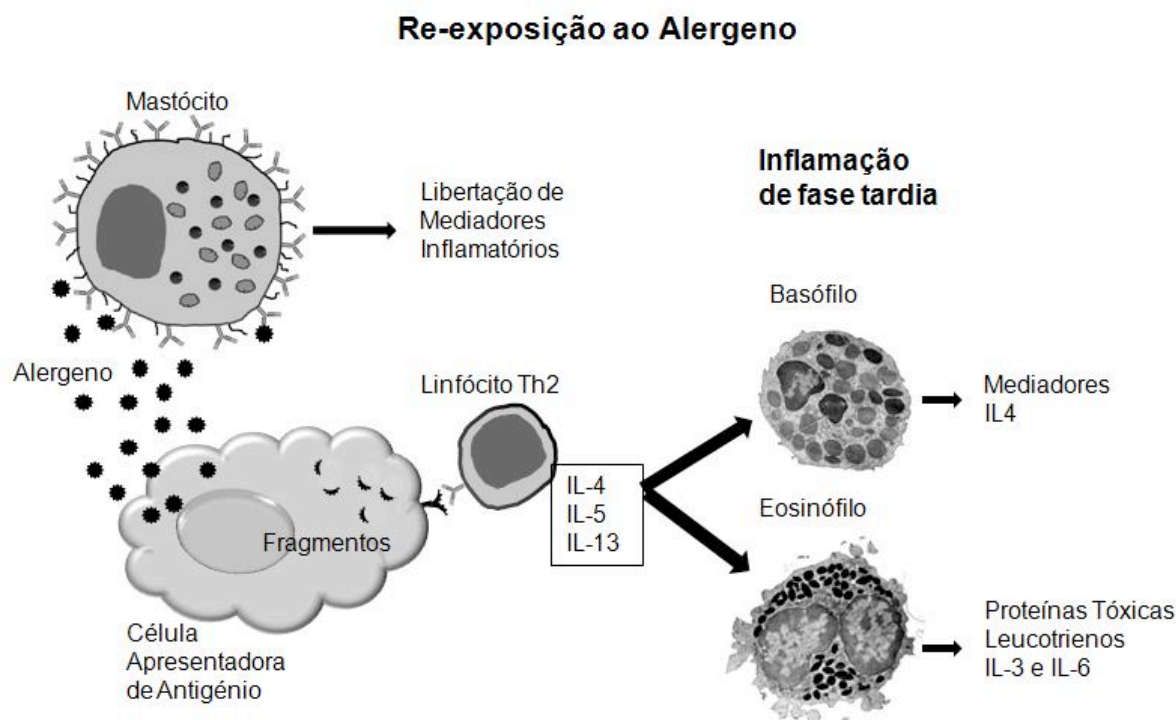
Na fase inicial ocorre libertação do conteúdo dos mastócitos via exocitose (desgranulação anafilática) seguida da libertação diferencial de outros mediadores.

A histamina [2-(4-imidazolil)-etilamina] é um mediador proteico libertado pelos mastócitos na fase inicial da resposta inflamatória. Trata-se de uma hormona autacóide que resulta da descarboxilação enzimática do aminoácido histidina (*Gelfand et al., 2005*).

Os mediadores inflamatórios libertados na fase tardia pelos mastócitos são, na sua maioria, mediadores lipídicos, derivados de ácidos gordos poliinsaturados como o ácido araquidónico, o ácido linoleico, o ácido eicosapentanóico e o ácido docosahexanóico (Figura 2).

O ácido araquidónico pode ser convertido por duas classes principais de enzimas: ciclooxigenase e lipooxigenase. A acção das enzimas da classe ciclooxigenase resulta na produção de prostanóides, tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Por outro lado, as lipooxigenases convertem o ácido araquidónico em leucotrienos.

Os prostanóides mais frequentemente implicados na inflamação do epitélio das vias aéreas e, portanto, na activação da doença alérgica, são a prostaglandina (PG) D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, prostaciclina (também designada PG I<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>).



**Figura 2:** Representa o conceito actual da patogénia da reacção alérgica. Exposições subsequentes, ao mesmo alérgeno, provocam libertação imediata de mediadores inflamatórios, com activação posterior de Linfócitos Th2, resultando na estimulação de Basófilos e Eosinófilos. *IL*, interleucina. *Adaptado de Norman PS, 2004.*

A PGD<sub>2</sub> é produzida por mastócitos e encontra-se associada ao componente inflamatório da asma alérgica, estando aumentada cerca de 150 vezes no lavado broncoalveolar de asmáticos com doença activa comparativamente a indivíduos não asmáticos. Pelo contrário a PGE<sub>2</sub>, tem essencialmente uma actividade anti-inflamatória embora também esteja comprovada alguma capacidade para provocar efeitos pro-inflamatórios na via aérea (Nauta et al., 2008).

A PGI<sub>2</sub> e o TxA<sub>2</sub> são membros da família dos prostanóides que também actuam como mediadores pro-inflamatórios embora lhes seja reconhecido um papel dominante a nível do

sistema cardiovascular. Existem no entanto alguns dados que sugerem propriedades anti-inflamatórias da prostaglandina I<sub>2</sub> (*Takahashi et al., 2002*).

Além dos prostanóides que são produzidos pela acção da ciclooxigenase, o ácido araquidónico pode ser convertido por mecanismos não enzimáticos em isoprostanos. Estes mediadores possuem uma grande diversidade de actividades biológicas, promovendo, por exemplo, o aumento da adesividade dos monócitos às células endoteliais, favorecendo a inflamação das vias aéreas (*Nauta et al., 2008*).

Os leucotrienos são outra classe de mediadores biológicos, sintetizados durante a acção inicial da enzima lipooxigenase sobre o ácido araquidónico e desempenham actividade biológica diversa. Os leucotrienos B<sub>4</sub> demonstraram ser potentes mediadores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos. Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> são potentes mediadores espasmogénicos, que actuam directamente no músculo liso. Actuam ainda no recrutamento celular, produção de muco e remodelação da via aérea (*Ogawa and Calhoun, 2006*).

O ácido linoleico pode ser convertido em dois derivados hidroperóxicos que podem ser produzidos pelos macrófagos pulmonares e células do epitélio traqueal. Os seus metabolitos actuam como mediadores no processo inflamatório das vias aéreas, possuindo propriedades quimiotáticas atraindo granulócitos (*Nauta et al., 2008*).

Os mastócitos são células que desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio tecidular e na defesa do organismo. Secretam, como foi referido, histamina prostaglandinas e leucotrienos, induzindo broncocronstrição, hipersecreção de muco e edema das mucosas. Secretam ainda citocinas pro-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13, as quais regulam a síntese de IgE, a inflamação mediada por eosinófilos e a síntese de citocinas pro-fibrogénicas como o factor de crescimento tumoral  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o factor de crescimento de fibroblastos (FGF) (*Bradding et al., 2006*).



Para a fase tardia da resposta inflamatória contribui ainda a libertação adicional de mediadores inflamatórios desencadeada por eosinófilos, neutrófilos, basófilos, macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> (Rolland et al., 2009).

## **IMUNOTERAPIA**

A Imunoterapia para tratamento de doenças alérgicas respiratórias foi introduzida por Noon em 1911, tendo sido desenvolvida desde então. Encontra-se actualmente difundida por todo o Mundo para o melhor tratamento de rinite e asma alérgicas (Norman, 2004).

Fundamenta-se na administração gradual de doses sucessivamente crescentes de alergénios de forma a induzir tolerância, e a reduzir a sintomatologia após a exposição a determinado alergénio (Di Lorenzo et al., 2009).

A fisiopatologia da doença alérgica é complexa. No entanto, acredita-se que esta é influenciada por vários factores, nomeadamente a susceptibilidade genética, o modo de exposição ao alergénio, a dose a que o indivíduo está exposto e as características estruturais do próprio alergénio. A resposta imunitária e inflamatória que ocorre em resposta à exposição ao alergénio é alergénio-específica e requer que exista uma sensibilização prévia (Akdis e Akdis, 2007).

A imunoterapia baseada na administração de alergénios é altamente eficaz no tratamento de doentes seleccionados (Akdis e Akdis, 2007) que sofrem de doença mediada por IgE e representa o único tratamento imunomodulador específico de alergénio. Está comprovado que é eficaz quer na rinoconjuntivite quer na asma causada por alergénios inalados. É particularmente útil na polinose sazonal. A imunoterapia melhora a asma sazonal, reduz a hiperreactividade brônquica e oferece melhor qualidade de vida aos doentes portadores de doença alérgica (Rolland et al., 2009 e Till et al., 2004).

Existem duas vias distintas de administração do extracto de alérgénio: subcutânea e sublingual. A administração por via subcutânea deve ser efectuada exclusivamente em unidades de saúde especializadas, dado o risco de reacções sistémicas graves. A via sublingual pode ser administrada no domicílio, de acordo com indicações médicas rigorosas (*Rolland et al., 2009*).

## **IMUNOTERAPIA na DOENÇA ALÉRGICA**

A resolução da inflamação na resposta alérgica tem sido alvo de investigação em inúmeros estudos nomeadamente com recurso a fármacos controladores da doença, como corticosteroides ou, mais recentemente, anticorpos monoclonais. No entanto, nenhum destes fármacos é antigénio-específico. A imunoterapia específica (ITE) actua no sistema imunitário e conduz a um estado de tolerância a determinados alérgénios, reduzindo a necessidade do uso de fármacos controladores da doença e da sintomatologia a longo prazo (*Pipet et al., 2009*).

A maioria dos estudos realizados com o objectivo de conhecer o mecanismo através do qual o organismo de indivíduos susceptíveis se torna tolerante a determinados alérgénios assenta na expectativa de que a imunoterapia aumenta a imunidade Th1 alérgénio-específica enquanto reduz a resposta Th2 favorecedora da inflamação alérgica (*Norman, 2004 e Rolland et al., 2009*). O perfil Th2 caracteriza-se pela libertação de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (*Nauta et al., 2008*), enquanto o perfil Th1 é caracterizado pela entrada em circulação de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  (interferão  $\gamma$ ) com capacidade de minimizar a resposta inflamatória alérgica (*Norman, 2004*).

A imunoterapia específica irá actuar na produção de IgG e IgE, na apresentação antigénica, activação de células T e actuação de mastócitos e eosinófilos (*Pipet et al., 2009*).

O aumento de IgG específica, nomeadamente IgG4, descrito por *Nouri-Aria et al.* (*Norman, 2004*), ocorre após administração de ITE. Os anticorpos IgG4 não activam o complemento, tendo pouca ou mesmo nenhuma actividade pró-inflamatória (*Till et al., 2004*). A IgG4 é considerada um anticorpo bloqueante, prevenindo a ligação do alérgénio ao complexo IgE-receptor de alta afinidade (FcεRI), que se encontra à superfície de basófilos e mastócitos. Desta forma, limita a libertação de mediadores inflamatórios (*Pipet et al., 2009* e *Rolland et al., 2009*), como a histamina, por basófilos activados. Estes anticorpos bloqueantes também previnem a ligação do alérgénio a complexos IgE-receptores de baixa afinidade (FcγRIIB) na superfície de células B, diminuindo a capacidade destas células apresentarem o alérgénio a células T específicas (*Pipet et al., 2009*).

O papel central das células T na condução da resposta alérgica tem gerado inúmeras hipóteses relativas ao mecanismo de acção da imunoterapia. Além do desvio de células Th2 para células com o perfil Th1, ocorre também uma inibição da apresentação do alérgénio a células T alérgénio-específicas e normalização da resposta por células T reguladoras (Treg) (*Till et al., 2004*).

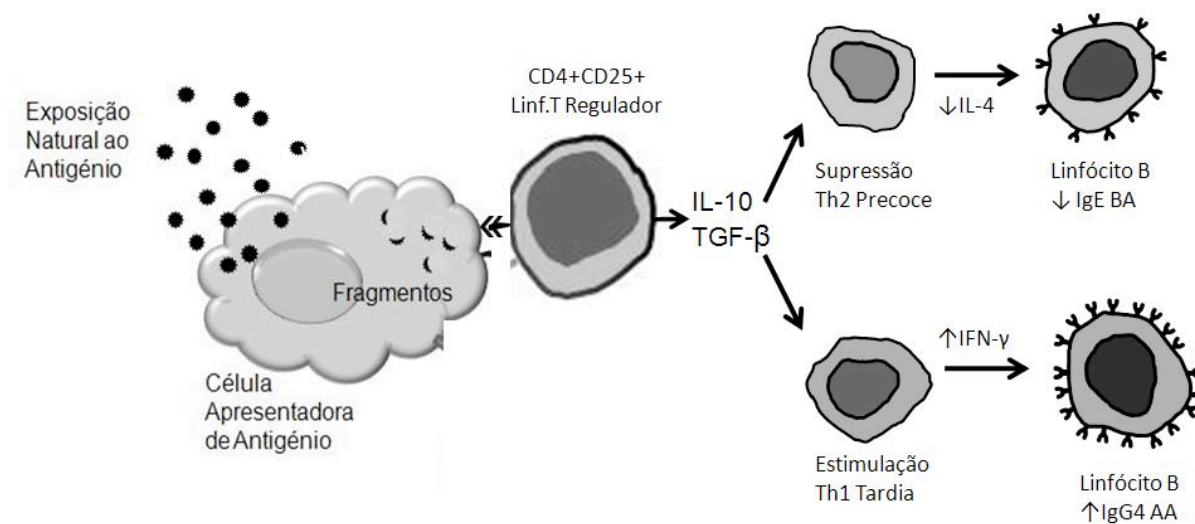
*Majori et al.* e *Oda et al.* estudaram a produção de citocinas antes e após a administração de ITE. Verificaram que ocorre diminuição dos níveis de IL-4 e aumento da libertação de IFN-γ, cujos níveis eram praticamente indetectáveis antes da administração de ITE. Desta forma, comprovam o desvio de células Th2 para células com perfil Th1. *Van Bever et al.* corroboram esta hipótese ao verificarem a diminuição da secreção de IL-4 e IL-5 após ITE em pacientes asmáticos (*Norman, 2004*).

As linhas celulares de células T estudadas por *Oda et al.* sugerem que a supressão do perfil Th2 ocorre primeiro e só mais tarde se verifica a estimulação de populações de células Th1, que vão emergindo lentamente (*Norman, 2004*).

Este desvio de Th2 para Th1, verificado a partir do perfil de produção de citocinas, estará subjacente à mudança nos isótipos dos anticorpos específicos de IgE para IgG4 e também para IgG1 e IgA (que se encontram comprovadamente aumentados após ITE). Os anticorpos IgG1 são, tal como os IgG4, considerados anticorpos bloqueantes, enquanto a IgA é conhecida por desempenhar um papel protector da superfície das mucosas.

As células Treg têm a função de conservar a homeostasia do sistema imunitário. O papel destas células Treg na indução de tolerância em células T alérgénio-específicas quer em indivíduos saudáveis, quer em indivíduos portadores de doença alérgica após ITE tem sido estudado e comprovado recentemente (Figura 3).

Há vários sub-tipos de células Treg: “Naturais” ou derivadas do timo, que são, habitualmente, células  $CD25^+$ . São consideradas as células T reguladoras *major*, cuja funcionalidade requer expressão do factor de transcrição Fox p 3 e capacidade de produção de  $TGF-\beta$ .



**Figura 3:** Modelo representativo da resposta do sistema imunitário na exposição a antígenos, após introdução parenteral de doses crescentes de alérgenos. Ocorre inibição da resposta Th2 e estimulação da resposta Th1, com diminuição de IgE de baixa afinidade e aumento de IgG4 de alta afinidade. *IL*, interleucina; *Ag*, antígeno; *Ig*, imunoglobulina; *IFN*, interferão; *TGF*, factor de crescimento tumoral; *AA*, alta afinidade; *BA*, baixa afinidade. Adaptado de Norman PS, 2004.

As células Treg induzidas são outro sub-tipo de células T, que se desenvolve na periferia, após estimulação antigénica. A sua função supressora é mediada por citocinas imunoreguladoras, entre as quais se destaca a importância da IL-10 e do TGF- $\beta$  (Rolland *et al.*, 2009).

Estas células são definidas como células T que diminuem ou mesmo suprimem a libertação de citocinas por células T efectoras, do tipo Th2 no caso dos doentes alérgicos, e que podem induzir apoptose de células T mediada por citocinas. São células que se encontram diminuídas nos indivíduos atópicos. Aliás, em vários estudos, verificou-se que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> apresentavam diminuição da capacidade quer de suprimir a proliferação de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> estimuladas por alérgénios, quer de induzir a produção de IL-5 quando comparados com indivíduos não atópicos (Ling *et al.*, 2004 e Thunberg *et al.*, 2007).

A indução de apoptose é outro dos mecanismos através dos quais actua a imunoterapia específica. Guerra *et al.* introduziu um novo conceito quando afirmou que a imunoterapia torna as células T produtoras de IL-4 (Th2) susceptíveis à apoptose após exposição ao alérgénio, facto que foi comprovado em vários estudos dos mesmo autores (Norman, 2004).

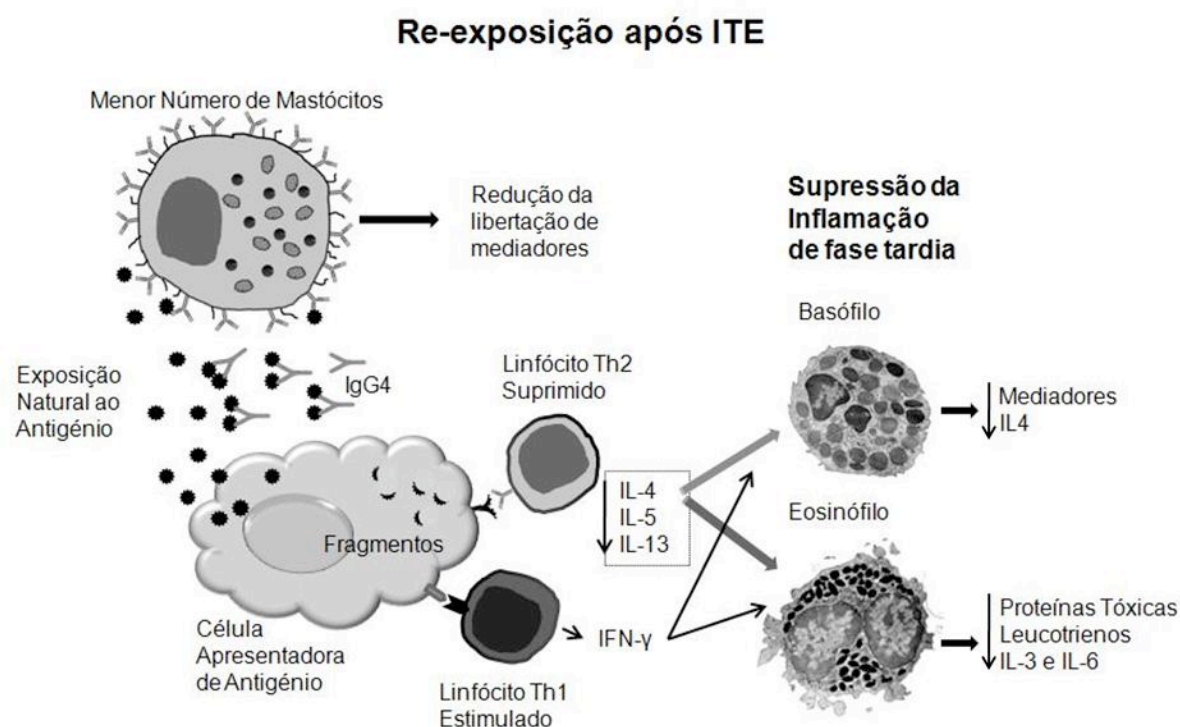
Apesar da maioria dos autores estudar o papel da imunoterapia nas células T, Hakansson *et al.* dedicou-se a estudar qual a função das células B e o efeito desta terapêutica nas referidas células. Verificou que em doentes não tratados, a exposição ao alérgénio promovia a elevação dos níveis séricos de células CD23<sup>+</sup> e CD40<sup>+</sup> ao mesmo tempo que se observava o aumento de anticorpos IgE (Hakansson *et al.*, 1998). Em doentes tratados com imunoterapia tais acontecimentos não ocorriam. Estes autores colocaram a hipótese de que a menor activação de células B, provavelmente devida a uma predominância do perfil Th1, pudesse estar também subjacente à eficácia da ITE.

Wachholz *et al.* (2003), por outro lado, elaboraram outra hipótese para justificar a menor activação de células B. Propuseram que os anticorpos IgG alérgénio-específicos

impedissem a formação de complexos alergénio-IgE, que permitiria a apresentação de alergénios (Norman, 2004).

Nouri *et al.* confirmaram esta hipótese após 2 anos de imunoterapia, afirmando que esta terapêutica poderá induzir a produção de IL-10 numa resposta alergénio-específica dependente da acção de anticorpos IgG4 (Nouri-Aria *et al.*, 2004).

De Amici *et al.*, estudaram os níveis séricos de citocinas antes e 6 meses após o início de ITE em indivíduos atópicos. Verificaram que antes de iniciar a terapêutica os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  se encontravam acima do normal. Após seis meses de tratamento estas citocinas apresentavam valores dentro da normalidade para indivíduos não atópicos, enquanto os níveis séricos de IL-2 e IL-6 tinham aumentado após o início da terapêutica. Estes dados demonstram uma clara redução na resposta inflamatória (De Amici *et al.*, 2001), como ilustrado na figura 4.



**Figura 4:** Modelo representativo da resposta do sistema imunitário na exposição ao alergénio, após tratamento com Imunoterapia Específica. Ocorre diminuição do número de mastócitos, com redução da libertação de mediadores inflamatórios, desvio do perfil Th2 para Th1 e supressão da inflamação de fase tardia. IL, interleucina; Ag, antígeno; Ig, imunoglobulina; IFN, interferão. Adaptado de Norman PS, 2004.

A ITE actua também na diminuição de basófilos, eosinófilos e mastócitos nos locais inflamatórios. O mecanismo que está na base deste acontecimento ainda não é conhecido. No entanto, vários autores como *Durham et al.*, comprovaram uma redução de 5 vezes no número de mastócitos no local da inflamação (*Durham et al., 1999*). *Wilson et al.*, verificaram que realmente existe redução do número de basófilos, eosinófilos e mastócitos nos locais inflamatórios, sem conseguirem provar se existe variação no número de neutrófilos (*Wilson et al., 2001*).

## IMUNOTERAPIA SUBLINGUAL vs SUBCUTÂNEA

A administração de imunoterapia via subcutânea existe desde o início do século XX. Tem-se demonstrado eficaz no tratamento da rinite alérgica e da asma alérgica. Mais recentemente foi introduzida a via sublingual, que tem revelado eficácia crescente, sendo amplamente utilizada nos Países Europeus (*Nelson, 2009*). É também igualmente eficaz na rinite (*Wilson et al., 2005*) e asma alérgicas (*Penagos et al., 2008*).

A utilização de qualquer uma das vias de administração estudadas tem obtido óptimos resultados na redução de sintomas e menor necessidade de medicação, melhorando a qualidade de vida dos doentes alérgicos. Por outro lado, pode prevenir o desenvolvimento de sensibilidade a alérgenos, assim como sustar a progressão para formas mais graves de doença, evitando o aparecimento da asma em doentes com rinite alérgica (*Nelson, 2009*). É por isso considerada uma intervenção capaz de modular e modificar o curso da doença.

A maioria dos estudos realizados com vista a demonstrar a eficácia quer da via sublingual, quer da subcutânea têm utilizado apenas um único alérgeno. E, apesar de algumas *guidelines* não recomendarem o uso de múltiplos alérgenos no mesmo tratamento, nos

Estados Unidos este tipo de tratamento é também efectuado (*Frew, 1993 e Esch, 2003*). Em qualquer dos casos não devem ser utilizados extractos de fontes alérgicas muito diferentes, já que é reduzida a eficácia e acrescido o risco de reacções adversas. A identificação e isolamento dos principais constituintes das fontes alérgicas naturais e a preparação de alergénios monoclonais para fins diagnósticos e terapêuticos tem permitido o recurso a formas de ITE mais direccionadas para a sensibilização de cada doente.

## **IMUNOTERAPIA SUBLINGUAL**

A via sublingual tem sido utilizada de forma crescente na Europa e nos Estados Unidos. Na escolha desta terapêutica existem seis variáveis importantes e que é necessário considerar:

- ☑ Critérios de selecção de pacientes;
- ☑ Padrão de sensibilização;
- ☑ Dosagem e preparação;
- ☑ Eficácia;
- ☑ Segurança;
- ☑ Custo.

Os estudos efectuados em pacientes sob terapêutica sublingual, têm sido realizados em adultos, com rinite alérgica e/ou asma ligeira a moderada. Habitualmente não incluem crianças até aos 12 anos de idade, nem pacientes com asma severa (*Krouse, 2009*). Aliás, um estudo de revisão recente demonstrou que esta via de administração não é eficaz em crianças até aos 12 anos (*Röder et al., 2008*). Desta forma, a extrapolação dos resultados obtidos em adultos para a população pediátrica terá que ser manuseada com extremo rigor e atenção.



A via sublingual ainda não foi estudada em populações de risco, como pacientes com asma não controlada, e em indivíduos que manifestaram reacções sistémicas adversas com imunoterapia subcutânea (*Krouse, 2009*).

Vários estudos confirmaram a eficácia clínica da imunoterapia sublingual na rinite alérgica provocada pela exposição quer a gramíneas, quer a ácaros (*Passalacqua et al., 2007*). Porém, quase todos os estudos realizados demonstraram a eficácia da imunoterapia utilizando apenas um único antigénio, sem descrever se os pacientes em estudo eram mono ou polissensibilizados (*Krouse, 2009*). A realidade é que ocorreu melhoria clínica nos pacientes em que foi administrado um único alergénio.

Por outro lado, existe uma preocupação, pelo menos teórica, acerca da capacidade de absorção da mucosa sublingual quando forem administrados múltiplos alergénios (*Nelson, 2007*).

A dose necessária de alergénio para obter resultados satisfatórios varia entre os 15 e 30 µg, o que significa uma dosagem muito mais elevada do que a necessária na ITE subcutânea. Por outro lado, os materiais indispensáveis à preparação da solução sublingual são diferentes dos necessários à administração subcutânea e mais dispendiosos (*Krouse, 2009*).

A eficácia da ITE administrada por via sublingual foi comprovada por diversos estudos, nomeadamente *Durham et al.* e *Dahl et al.*, que demonstraram redução da sintomatologia observada em pacientes com rinite alérgica induzida por pólen (*Durham et al., 2006* e *Dahl et al., 2006*). *Pajno et al.* verificou a redução da hiperreactividade brônquica em crianças com asma alérgica após 2 anos de ITE sublingual (*Pajno et al., 2004*). No entanto, outro estudo com autores comuns, veio demonstrar que a ITE sublingual quando comparada com a administração de propionato de fluticasona inalada não tinha qualquer benefício

adicional em pacientes com asma alérgica (crianças), melhorando apenas sintomas não relacionados com a hiperreactividade brônquica (*Pajno et al., 2003*).

*Wilson et al. (2005)* e *Penagos et al. (2006)* estudaram a eficácia da ITE sublingual em indivíduos com rinite alérgica (adultos e crianças e apenas crianças, no primeiro e segundo estudos, respectivamente), tendo obtido resultados significativos quer na redução de sintomatologia, quer na diminuição do recurso a medicação crónica. *Calamita et al. (2006)* e *Penagos et al. (2008)* verificaram a eficácia da ITE sublingual em pacientes com asma (adultos e crianças e apenas crianças, no primeiro e segundo estudos, respectivamente), tendo obtido resultados significativos somente no segundo estudo, nomeadamente no que respeita a redução de sintomas e a necessidade de recorrer a medicação (*Pipet et al., 2009*).

A via de administração sublingual representa uma forma terapêutica mais segura do que a via subcutânea. Poderá ser preferida quando estamos perante pacientes com asma moderada e quando pretendemos tratar os pacientes no domicílio (*Krouse, 2009*). Aliás, uma revisão de estudos recente demonstrou que numa população de indivíduos portadores de rinite alérgica e asma moderada não ocorreu qualquer morte, num universo de cerca de 1 000 000 de doses administradas (*Cox et al., 2006*). Foram, porém, reportados casos de anafilaxia após ITE sublingual, dois dos quais após administração de terapêutica utilizando múltiplos alérgénios (*Krouse, 2009*).

Habitualmente esta forma de administração é bem tolerada. Os efeitos adversos mais frequentes incluem sintomas locais, como prurido oral e edema da mucosa, referidos em cerca de 50% dos pacientes, ou gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreia e epigastralgias em cerca de 17% dos indivíduos tratados. São efeitos adversos que podem ser corrigidos após redução da dose administrada (*Passalacqua et al., 2007*). Reacções sistémicas são raras, ocorrendo em cerca de 0,056% das doses administradas nos Estados Unidos, podendo traduzir-se por exacerbações de asma severa com necessidade de hospitalização.

Embora possa ser administrada pelo próprio paciente, no domicílio, as doses iniciais devem ser administradas nos Serviços de Saúde, com a presença do médico prescritor. Durante os primeiros meses, mesmo quando já poderão fazer a administração em casa, os pacientes deverão manter uma monitorização rigorosa (*Krouse, 2009*).

Como foi referido anteriormente, a ITE sublingual implica a administração de doses mais elevadas de antígenos para obter resultados similares aos obtidos com ITE subcutânea. Assim, esta forma terapêutica tem custos mais elevados do que a via subcutânea.

Estima-se que um dia de tratamento de um paciente alérgico a gramíneas a fazer monoterapia, no domicílio, num país como a Alemanha tenha um custo semelhante a 2.95 Euros. Se considerarmos terapêuticas utilizando múltiplos alérgenos o custo será muito mais avultado, o que poderá tornar esta terapêutica proibitiva (*Krouse, 2009*). Num estudo realizado durante três anos de ITE sublingual obteve-se um custo total de 416 Euros (*Pokladnikova et al., 2008*).

## **IMUNOTERAPIA SUBCUTÂNEA**

A imunoterapia subcutânea é amplamente utilizada na Europa e nos Estados Unidos, encontrando-se disponível na maioria dos Países desenvolvidos. Os extractos de alérgenos administrados estão padronizados, quer biologicamente, quer imunologicamente, porém os excipientes utilizados podem variar tornando, por vezes, difícil a comparação do conteúdo de cada fórmula comercializada (*Passalacqua et al., 2007*).

Na aplicação da ITE subcutânea é também necessário, tal como na via sublingual, proceder à criteriosa escolha dos pacientes a submeter a esta terapêutica, bem como ter em consideração o padrão de sensibilização, a dosagem necessária, a eficácia, a segurança da terapêutica e qual o seu custo, quer para o doente, quer para o Serviço Nacional de Saúde.

Segundo a *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* a ITE subcutânea deverá ser administrada a crianças com mais de 5 anos de idade e a adultos portadores de doença alérgica, seja rinite ou asma, com sensibilidade a ácaros, pólen e pêlo de gato, quando a evicção dos alérgenos não é suficiente. Esta Academia Europeia não recomenda a realização de terapêutica com múltiplos alérgenos (*Alvarez-Cuesta et al., 2006*). No entanto, nos Estados Unidos esta é uma forma terapêutica largamente utilizada. Aliás, um estudo norte americano descreveu 14 anos de utilização de ITE subcutânea com administração de múltiplos alérgenos obtendo resultados satisfatórios. Neste estudo, *Johnstone et al.*, avaliaram três grupos de crianças com asma alérgica: ao primeiro era administrado placebo, ao segundo um extracto diluído na razão 1:5000 e ao último era administrado o extracto na maior dose tolerada. Os resultados obtidos revelaram ausência de sintomatologia em 22%, 66% e 78% dos primeiro, segundo e terceiro grupos descritos, respectivamente (*Johnstone e Dutton, 1968*).

Num estudo em pacientes adultos com rinoconjuntivite, que se tornavam sintomáticos com a exposição ao pólen da planta *Tanacetum parthenium*, a administração de ITE subcutânea com extractos de múltiplos alérgenos sem o alérgeno *major* (pólen de *Tanacetum parthenium*) obteve resultados significativos e semelhantes aos obtidos com a administração do alérgeno *major* (*Lowel e Franklin, 1965*).

Noutro estudo, *Bousquet et al.*, demonstraram que em adultos com rinite alérgica associada ou não a asma, sensíveis a gramíneas, o resultado obtido após administração de ITE subcutânea era diferente para indivíduos mono ou polissensibilizados (*Nelson, 2009*).

A dose que é necessário administrar por via subcutânea para obter resultados significativos varia consoante o alérgeno em causa. No tratamento da sensibilidade ao pólen a dose varia entre os 13 e os 41µg, consoante a planta em causa. No que respeita a terapêutica dos pacientes alérgicos a ácaros, nomeadamente ao *Dermatophagoides pteronyssinus* a dose

de manutenção varia de 5 a 11,5 µg. Nos indivíduos que apresentam sensibilidade ao pêlo de gato a dose administrada pode variar entre 13 e 15 µg (*Incorvaia et al., 2006*).

A eficácia clínica da ITE subcutânea encontra-se em estudo, sendo, actualmente, reconhecido o seu valor. Foi no tratamento da rinite alérgica que se realizaram a maioria dos estudos, sendo esta a doença em que a sua aplicação se encontra melhor estudada. Uma meta-análise publicada em 2007 considerando 51 estudos, incluindo 2871 participantes (crianças e adultos), demonstrou redução da sintomatologia em 50 estudos e verificou uma significativa redução no recurso a medicação em 13 estudos. A duração do tratamento também é um factor preponderante na ocorrência de recidivas. *Mosbech et al.* demonstraram ausência de recidivas em 38 pacientes 6 anos após a interrupção do tratamento, o qual foi realizado por um período de 2,5 anos. Noutro estudo, em que o seguimento foi efectuado durante 12 anos após a descontinuação da terapêutica, verificou-se manutenção da melhoria clínica e da menor necessidade de recurso a medicação (*Pipet et al., 2009*). *Des Roches et al.* avaliaram durante 3 anos um grupo de pacientes tratados por um período que variava entre 12 e 19 meses. Verificou que ocorreram recidivas em 50% dos pacientes um ano após a interrupção do tratamento e em 60% após 3 anos sem terapêutica. Estes autores concluíram também que quanto mais curto é o tratamento, maior é probabilidade de recidiva (*Des Roches et al., 1996*).

A eficácia da ITE subcutânea foi estudada numa meta-análise de *Abramson et al.*, publicada pela primeira vez em 1995, tendo sido actualizada até à data. A última actualização inclui 70 ensaios clínicos, tendo demonstrado que este tratamento reduz a sintomatologia dos pacientes asmáticos e a necessidade de realização de medicação crónica. No entanto, nesta meta-análise não se obtiveram resultados estatisticamente significativos no que respeita a melhoria da função pulmonar, apenas foi possível provar uma redução na hiperreactividade brônquica (*Pipet et al., 2009*).

Outros três estudos, dois dos quais em adultos (*Basomba et al., 2002* e *Garcia-Robaina et al., 2006*) e um em crianças (*Pifferi et al., 2002*), todos pacientes asmáticos com sensibilidade a ácaros, vieram corroborar o que já tinha sido comprovado em estudos anteriores: redução de sintomas, menor necessidade de medicação e diminuição da hiperreactividade brônquica.

O maior risco da administração de ITE por via subcutânea é a ocorrência de choque anafilático. Porém, as reacções mais frequentes são locais ou loco-regionais, que poderão ser evitadas com redução da dose que é administrada. Podem ainda ocorrer reacções como rinite, conjuntivite ou mesmo asma. Nestes casos também deve-se proceder à redução da dose e posterior aumento gradual para a dose recomendada (*Pipet et al., 2009*).

Vários estudos reportam casos de morte por anafilaxia após administração de ITE subcutânea. *Kordash e Miller* verificaram 13 casos fatais num estudo que decorreu entre 1992 e 1996, tendo concluído que o factor de risco *major* nestes pacientes era a presença de asma não controlada. Demonstraram que a crise de asma ocorre cerca de 30 minutos após a administração, ao contrário das outras formas de reacção sistémica que se verificam apenas alguns minutos depois da administração. Os mesmos autores preconizam que pacientes com asma não controlada e FEV1 inferior a 70% se mantenham sob observação, em meio hospitalar, pelo menos meia hora após qualquer administração (*Pipet et al., 2009*).

Entre 1959 e 1984 foram verificados 46 óbitos devidos a ITE subcutânea nos Estados Unidos. A maioria destes óbitos foi atribuído a erro na dosagem, no intervalo entre administrações, equipamento inadequado e asma não controlada (*Lockey et al., 1987*).

Estudos retrospectivos mais recentes demonstram menos efeitos adversos graves, demonstrando que mesmo os efeitos locais ou loco-regionais não são muito frequentes.

*Winter et al.* estudou os efeitos adversos da ITE subcutânea para gramíneas e plantas da família *Betulaceae*, tendo verificado a ocorrência de reacções sistémicas em 3,3% do

primeiro grupo e em 0,7% no segundo grupo. Todas estas reações sistémicas foram de menor gravidade e facilmente controladas, no entanto, não foi encontrado o agente precipitante (*Winther et al., 2000*).

Um estudo posterior, de fase IV (após comercialização do fármaco), demonstrou a ocorrência de reacções sistémicas *minor* em 3,7% dos pacientes e em 0,9% do total de doses administradas. Outro estudo, desta vez retrospectivo, de 2004, afirma que em 65 pacientes a receber ITE subcutânea com múltiplos alérgenos, ocorreu apenas um episódio de reacção sistémica grave (*Passalacqua et al., 2007*).

Esta terapêutica tem um custo associado elevado. No entanto, quando se compara este custo com o valor dispendido no tratamento sintomático a longo prazo, verifica-se que é menos dispendioso tratar a origem da doença, ou seja é preferencial optar pela ITE do que manter o doente controlado sintomaticamente durante toda a vida (*Bruggenjur et al., 2008*).

Pode-se estimar o custo de três anos de terapêutica com ITE subcutânea em 482 Euros (*Pokladnikova et al., 2008*).

Até à data foram realizados poucos estudos comparativos entre ITE sublingual e ITE subcutânea. A Tabela 1 refere-se a alguns desses estudos comparativos e aos resultados obtidos nos mesmos.

	<b><u>Quirino et al. 1996</u></b>	<b><u>Mungan et al. 1999</u></b>	<b><u>Khinchi et al. 2004</u></b>	<b><u>Mauroa et al. 2007</u></b>
<b>Método</b>	Duplamente cego, sem controlo de placebo	Aleatório, com controlo de placebo	Aleatório, duplamente cego, com controlo de placebo	Aleatório, sem controlo de placebo
<b>Doença</b>	Rinite	Rinite e Asma	Rinite e Asma	Rinite
<b>Alergénio</b>	Gramínea	Ácaros	<i>Betulaceae</i>	<i>Betulaceae</i>
<b>Razão de dose SL/SC</b>	2,4	~100	~175	~100
<b>N.º pacientes</b>	20	36	71/48	47/40
<b>Idade</b>	Adultos	Adultos	Adultos	Adultos
<b>Duração</b>	2 estações polínicas	1 ano	2 anos	1 estação polínica
<b>Score Medicação</b>	ITSL/ITSC: NS	ITSL/placebo: p<0,01 ITSC/placebo: p<0,01	ITSL/placebo: p<0,02 ITSC/placebo: p<0,002 ITSL/ITSC: NS	ITSL/ITSC: NS
<b>Score Sintoma maior</b>	ITSL/ITSC: NS	ITSL/placebo: p<0,01 para Rinite; NS para Asma ITSC/placebo: p<0,01 ITSL/ITSC: NS	ITSL/placebo: p<0,002 ITSC/placebo: p<0,002 ITSL/ITSC: NS	SD
<b>Avaliação Imunológica</b>	Apenas grupo SC: mudança IgG4 (p<0,001)	Aumento de IgG4 em ambos (ITSL e ITSC)	SD	Apenas Grupo SC: aumento de IgG4 (p=0,01)
<b>Segurança: reacções sistémicas</b>	SD	Nenhuma	29% Grupo SC 0% Grupo SL	16% Grupo SC 0% Grupo SL

**Tabela 1:** Estudos comparativos entre Imunoterapia Específica Sublingual e Imunoterapia Específica Subcutânea. *SL*, sublingual; *SC*, subcutânea; *ITSL*, imunoterapia sublingual; *ITSC*, imunoterapia subcutânea; *SD*, sem dados disponíveis; *NS*, não significativo. *Adaptado de Pipet et al., 2009.*



## **DISCUSSÃO**

A alergia, seja traduzida por rinite, rinoconjuntivite ou asma, tem na sua origem molecular a activação de elementos chave, como células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B e mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas e leucotrienos, entre outros). É na activação do mecanismo pró-inflamatório que actua a imunoterapia específica.

Os estudos retrospectivos realizados até à data demonstraram que o desvio do perfil Th2 para Th1 constitui a base de actuação da imunoterapia específica. Verifica-se que, após meses/anos de terapêutica alérgico-específica, há aumento dos níveis séricos de IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ , promovendo actividade anti-inflamatória, enquanto a redução da libertação de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, reduz a actividade pró-inflamatória.

Por outro lado, também se confirma o aumento de anticorpos bloqueantes IgG4, IgG1 e IgA, supressão do complexo IgE-alérgico e activação de células Treg. Estas encontram-se dependentes da actividade de IL-10 e TGF  $\beta$ , cuja elevação está também confirmada por vários autores.

Observa-se menor número de mastócitos circulantes, menor número de eosinófilos e basófilos e, portanto, menor libertação de mediadores inflamatórios e ausência de resposta inflamatória, logo, ausência de reacção alérgica.

A imunoterapia específica pode, como referido anteriormente, ser administrada por duas vias: sublingual e subcutânea. Aqui, impõe-se uma questão: qual será a melhor forma de tratamento para cada doente alérgico?

Primeiro é necessário referir que as duas vias de administração do fármaco não possuem a mesma aplicabilidade. Quando nos referimos a crianças verificamos que a via sublingual não se encontra estudada no grupo etário com menos de 12 anos de idade.

Relativamente à via subcutânea verificamos que não é aplicável a indivíduos menores que 5 anos.

Em adultos podemos afirmar que os critérios de selecção são semelhantes. O que pode levar o médico prescriptor a optar por uma ou por outra será a capacidade de um paciente cumprir a terapêutica no domicílio e o conforto de não ter a necessidade de se deslocar a uma Unidade de Saúde.

Quando nos referimos a imunoterapia sublingual, habitualmente referimo-nos a monoterapia, sejam os pacientes mono ou polissensibilizados. A eficácia e a segurança da utilização de múltiplos alérgenos no mesmo fármaco ainda não se encontra comprovada. Por outro lado, nos Estados Unidos, é amplamente utilizada a politerapia, com múltiplos alérgenos na mesma amostra, mas utilizando a via de administração subcutânea.

Vários estudos demonstram que a dose administrada por via sublingual é mais elevada. Porém, verificamos que a dose é também dependente do alérgeno em causa, podendo ser maior ou menor se compararmos diferentes sensibilidades.

Ambas as formas de imunoterapia são eficazes. Aliás, quando analisamos a tabela 1 verificamos que a eficácia é semelhante. Em todos os estudos representados a diferença de eficácia entre a imunoterapia sublingual e a imunoterapia subcutânea não é significativa, nem no que respeita a diminuição da necessidade de recorrer a medicação, nem no que concerne a redução da sintomatologia. Ambas melhoram significativamente a qualidade de vida dos doentes quando comparadas com placebo. Apenas um dos estudos (*Mungan et al., 1999*) não obteve resultados significativos quando comparou a capacidade da imunoterapia sublingual na melhoria dos sintomas *major* em doentes asmáticos com a actividade de placebo. Em todos os outros estudos os resultados foram significativos, quer em doentes asmáticos, quer em doentes com rinite alérgica, quando comparada a eficácia da imunoterapia sublingual e imunoterapia subcutânea com placebo.

Podemos ainda inferir que ambas as formas de imunoterapia se encontram mais estudadas no controlo da rinite alérgica, até porque, quando iniciada a terapêutica nesta fase, impede a progressão da doença para asma ligeira, moderada ou mesmo severa.

Deste estudo retrospectivo aqui apresentado podemos deduzir que a via de administração sublingual é mais segura do que a subcutânea. Na primeira não estão descritos casos de fatalidades durante a terapêutica, enquanto que na segunda são vários os casos de morte conhecidos. Na tabela 1 também podemos confirmar a maior segurança da imunoterapia sublingual, uma vez que, quando descritas, as reacções sistémicas são de 0% para a via sublingual, enquanto que para a via subcutânea são iguais ou superiores a 16%.

Outro factor importante a considerar é o impacto económico que uma terapêutica como esta tem quer para o doente, quer para o Estado que a comparticipa. Na formulação do medicamento que é administrado verificamos que a imunoterapia sublingual é realmente mais dispendiosa. No entanto, quando optamos por uma abordagem mais ampla, chegamos a um consenso: a imunoterapia subcutânea tem um custo mais avultado do que a sublingual. São vários os factores que contribuem para o encarecer desta forma terapêutica. No que respeita o paciente, referimo-nos ao custo das deslocações mensais até à Unidade de Saúde mais próxima da residência. O Estado, por seu turno, tem que garantir o pagamento de uma equipe multidisciplinar que irá intervir na aplicação da terapêutica.

Por outro lado, também verificamos que o tratamento sintomático a longo prazo destes pacientes é mais dispendioso do que a realização de imunoterapia específica.

Portanto, podemos concluir que a imunoterapia é o único tratamento eficaz na doença alérgica, seja rinite, rinoconjuntivite ou asma, actuando na origem da doença.

Qualquer uma das vias de administração melhora a qualidade de vida dos pacientes, no entanto, a via sublingual parece ser mais apelativa: é mais confortável para o doente (o que

pode melhorar a adesão à terapêutica), tem menos efeitos secundários e é igualmente eficaz. Contudo, é apenas aplicável em monoterapia, pelo menos na actualidade.

Há, no entanto, aspectos em que a investigação é incompleta. Estes aspectos incluem a aplicação apropriada em doentes polissensibilizados, o intervalo entre a administração das diferentes doses e o tempo que deverá durar cada tratamento com vista ao melhor resultado a longo prazo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Akdis M, Akdis C (2007) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol*; 119: 780-789.

Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E (2006) Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*; 61 (Supl. 82): 1-20.

Basomba A, Tabar AI, Des Rojas DH, Garcia BE, Alamar R, Olaguibel JM, et al. (2002) Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol*; 109: 943-948.

Bradding P, Walls A, Holgate ST (2006) The role of mast cells in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*; 117: 1277-1284.

- Bruggenjur B, Reinhold T, Brehler R, Laagenke E, Wiese G, Machate U, Willich SN. (2008) Cost-effectiveness of specific subcutaneous immunotherapy in patients with allergic rhinitis and allergic asthma. *Annals of allergy, asthma and immunology*; 101 (3): 316-324.
- Cox LS, Linnemann DL, Nolte H, et al. (2006) Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J. Allergy Clin. Immunol*; 117: 1021-1035.
- Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, et al. (2006) Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol*; 118: 434-440.
- De Amici M, Puggioni F, Casali L, Alesina R (2001) Variations in serum levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$ ; during specific immunotherapy. *Ann Allergy*; 86: 311-313.
- Des Roches A, Paradis L, Knani J, Hejjaoui A, Dhivert H, Chanez P, et al. (1996) Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. V. Duration of the efficacy of immunotherapy after its cessation. *Allergy*; 51: 430-433.
- Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor ML, Rizzo M, Castello F, Martinelli N, Ditta V, Lo Bianco C, et al. (2009) Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol*; 123: 1103-1110.

Durham SR, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Varga EM, Frew AJ, et al. (1999) Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy*; 29: 1490-1496.

Durham SR, Yang WH, Pedersen MR, Johansen N, Rak S (2006) Sublingual immunotherapy with once-daily grass-allergen tablets: a randomised controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol*; 117: 802-809.

Esch RE (2003) Specific immunotherapy in the USA: general concept and recent initiatives. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*; 94: 17-22.

Frew AJ (1993) Injection immunotherapy. *BMJ*; 307: 919-923.

Garcia-Robaina JC, Sanchez I, de la Torre F, Fernandez-Caldas E, Casanovas M. (2006) Successful management of mite-allergic asthma with modified extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in a double-blind, placebo-controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol*; 118: 1026-1032.

Gelfand EW (2005) The role of histamine in immune regulation. *Med Pulmonary Medicine*.

Hakansson L, Heinrich C, Rak S, Venge P (1998) Activation of B-lymphocytes during pollen season. Effect of immunotherapy. *Clin Exp Allergy*; 28: 791-798.

Incorvaia C, Frati F, Puccinelli P, Riario-Sforza GG, Dalbo S (2006) Dose dependence of efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy. *Monaldi archives for chest disease*; 65: 41-43.

Johnstone DE, Dutton A (1968) The value of hyposensitization therapy for bronchial asthma in children - a 14-year study. *Pediatrics*; 42: 793-802.

Krouse J, (2009) Sublingual immunotherapy for inhalant allergy: Cautious optimism. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 140: 622-624.

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. (2004) Relation of CD4<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*; 363: 608-615.

Lockey RF, Benedict LM, Turkeltaub PC, bukantz SC. (1987) Fatalities from immunotherapy and skin testing. *J. Allergy Clin. Immunol*; 79: 660-677.

Lowel FC, Franklin W (1965) A double-blind study of the effectiveness and specificity of injection therapy in ragweed hay fever. *N Engl J Med*; 273: 675-679.

Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA (2008) Mechanisms of allergy and asthma. *European Journal of Pharmacology*; 585: 354-360.

Nelson H (2009) Multiallergen immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*; 123: 763-769.

Nelson HS (2007) Allergen immunotherapy: where is it now?. *J. Allergy Clin. Immunol*; 119: 769-779.

Norman PS (2004) Immunotherapy: 1999-2004. *J. Allergy Clin. Immunol*; 113: 1013-1023.

Nouri-Aria KT, Kayhan A, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walter SM, et al. (2004) Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J. Immunol*; 172: 3252-3259.

Ogawa Y, Calhoun WJ (2006) The role of leukotrienes in airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol*; 118: 789-798.

Pajno GB, Passalacqua G, Vita D, Parmiani S, Barberio G (2004) Sublingual immunotherapy abrogates seasonal bronchial hyperresponsiveness in children with *Parietaria* induced respiratory allergy: a randomised controlled trial. *Allergy*; 59: 883-887.

Pajno GB, Vita D, Carminiti D, Parmiani S, Barberio G (2003) Impact of sublingual immunotherapy on seasonal asthma and skin reactivity in propionate. *Clin Exp Allergy*; 14: 216-221.

Passalacqua G, Durham S (2007) Allergic rhinitis and its impact on asthma update: Allergen immunotherapy. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*; pp 881-891.



Penagos M, Passalacqua G, Compalati E, Baena-Cagnani CE, Orozco S, Pedroza A, et al. (2008) Meta-analysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in pediatric patients, 3 to 18 years of age. *Chest*; 133: 599-609.

Pifferi M, Baldini G, Marrazini G, Baldini M, Ragazzo V, Pietrobelli A, et al. (2002) Benefits of immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract in asthmatic children: a three-year prospective study. *Allergy*; 57: 785-790.

Pipet A, Botturi K, Pinot D, Vervloet D, Magnan A (2009) Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. Mechanisms and proof of efficacy. *Respiratory Medicine*; 103: 800-812.

Pokladnikova J, Kremova I, Vlcek J. (2008) Economic evaluation of sublingual vs subcutaneous allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.*; 100: 482-489.

Röder E, Berger M, de Groot H, et al. (2008) Immunotherapy in children and adolescents with allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review. *Pediatric allergy and immunology*; 19: 197-207.

Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE (2009) Allergen-related approaches to immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*; 121: 273-284.

Takahashi Y, Tokuoka S, Masuda T, Hirano Y, Tanaka H, Inagaki N, Narumiya S, Nagai H (2002) Augmentation of allergic inflammation in prostanoïd IP receptor deficient mice. *Br. Journal Pharmacology*; 137: 315-322.

Thunberg S, Akdis M, Akdis CA, Gronneberg R, Malmstrom V, Trollmo C, et al. (2007) Immune regulation by CD4<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy*; 37: 1127-1136.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR (2004) Mechanisms of Immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol*; 113: 1025-1034.

Wachholz PA, Kristensen Soni N, Till SJ, Durham SR (2003) Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol*; 112: 915-922.

Wilson DR, Irani A-M, Walker SM, Jacobson MR, Mackay IS, Schwartz LB, et al. (2001) Grass pollen immunotherapy increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy*; 31: 1705-1713.

Wilson DR, Lima MT, Durham SR (2005) Allergen immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*; 60: 4-12.

Winther L, Malling HJ, Mosbech H. (2000) Allergen-specific immunotherapy in birch and grass-pollen-allergic rhinitis, II: side-effects. *Allergy*; 55: 827-835.